

SEPARADO DE

ACTAS Y TRABAJOS DEL PRIMER CONGRESO
SUDAMERICANO DE BIOLOGIA
(La Plata 12 - 24 Octubre 1959)
TOMO 1

BIBLIOTECA
JORGE D. WILLIAMS

**ELECTROFEROGRAMAS DE PROTEÍNAS SÉRICAS
EN EL GÉNERO BUFO**

por

F. BERTINI y J. M. CEI

(Instituto de Biología, Mendoza, Arg.)

COLECCION HERPETOLOGICA
Y BIBLIOTECA
Dr. José Miguel Cei

La utilidad del estudio electroforético de las proteínas séricas, para investigaciones sobre afinidad sistemática, ya subrayada por varios autores y por nosotros en otra comunicación, resalta por la presente contribución, que tiene por objeto las relaciones de afinidad entre diversas de las especies de *Bufo* que viven en la Argentina, y en particular entre las poblaciones de *Bufo arenarum* Hensel, especie predominante, distribuida sobre una área geográfica extensa.

Los datos que se han reunido sobre *Bufo paracnemis*, *Bufo spinulosus* y *Bufo granulosus*, son solamente preliminares e informativos, tratándose de proteínas conservadas. Sobre *Bufo arenarum* se trabajó utilizando sueros frescos de muestras individuales, apenas extraídos por punción cardíaca y examinados con la técnica de electroforesis en papel (aparato CIENCU, Mendoza; 6 horas. 800 V; Buffer veronal sódico PH 8.6, fuerza iónica 0.06; papel Wattmann 3MM; revelado con azul de Bromofenol 0.2 % en metanol saturado de bicloruro de mercurio).

Bufo arenarum es una especie distribuida desde Brasil meridional (Rio Grande do Sul) hasta Río Negro y al Oeste hasta la Cordillera. Lutz (1934) subrayaba las afinidades morfológicas con *Bufo marinus*, por lo menos en las poblaciones brasileñas. En la Argentina es simpátrida con *Bufo paracnemis* y en Misiones con *Bufo marinus (ictericus)*. En varias zonas cordilleranas (Salta, Catamarca, Mendoza) es simpátrida con *Bufo spinulosus* Wiegmann, con morfosis de altura que lo hacen sumamente similar a esta forma. Debido a la gran cantidad de nichos ecológicos ocupados por *Bufo arenarum*, y habiendo sido objeto de señalizaciones anteriores el polimorfismo

de esta especie en la región árida de Mendoza (Cei, 1956), era oportuno un análisis de los electroferogramas en distintas poblaciones, representadas por muestras homogéneas.

Los ejemplares, todos del mismo sexo (masculino), adultos, y de la misma época (15 Julio-15 Agosto 1959), mantenidos en las mismas condiciones ambientales, proceden de muestras de Córdoba (9 ejemplares), de Tucumán (10 ejemplares), de Buenos Aires (10 ejemplares) y de Mendoza (24 ejemplares), siendo establecido como promedio de varias tiras el valor de las fracciones proteínicas reconocidas para cada ejemplar.

Se han podido reconocer con la técnica seguida en los electroferogramas cuatro fracciones denominadas provisoriamente como A, G1, G2 y G3, a partir de la de mayor movilidad. Como se desprende por la Tabla I, donde los datos se expresan en porcentajes relativos de las varias fracciones, hay un grupo de poblaciones (Tucumán, Córdoba, Buenos Aires) en las que las fracciones indicadas como G2 y G3 no presentan nunca diferencias poblacionales estadísticamente significativas. Pero entre las fracciones G2 y G3 de la muestra de Mendoza y las fracciones correspondientes de todas las otras, la diferencia aparece siempre estadísticamente significativa, con la sola excepción de la fracción G3 entre Mendoza y Tucumán. Las otras fracciones (G1 y G2) acusan algunas diferencias poblacionales, que en algunos casos presentan significado estadístico, como puede observarse en la Tabla I. Es interesante subrayar que las poblaciones de Mendoza y Córdoba, las más cercanas entre sí geográficamente, son las que evidencian diferencias estadísticamente significativas para todas las fracciones electroforéticas. Otro dato de interés que nos permite reconocer como carácter poblacional las diferencias seroproteínicas en estos *Bufo*, es la relación entre los porcentajes de G1 y G2. En Mendoza esta relación, o "ratio", acusa un valor de 1.07, mientras que en todas las otras poblaciones ese valor es siempre inferior a 1. Por la Tabla II podemos comprobar que esta relación se mantiene también constante en muestras de proteínas conservadas (verano 1959; observadas en Agosto 1959) pertenecientes a "pools" de animales adultos de Buenos Aires, Tucumán y San Luis (sierras). A pesar del valor crítico menor que atribuimos a las proteínas conservadas —por su posible desnaturalización, pérdida de carga, o deficiencia en la colorabilidad— es interesante subrayar que la relación G1/G2 queda inalterada en la muestra de Tucumán (0.87), es muy parecida en la de Buenos Aires (0.73 y 0.68) y también en la muestra de San Luis (Sierras) frente a su valor correspondiente en las

proteínas frescas de Córdoba (0.90 a 0.91). Lo mismo ocurre en la muestra de Mendoza, donde queda inalterada la relación (1.07).

Las gráficas que acompañan a los electroferogramas característicos, expresan las curvas correspondientes a las lecturas fotocolorimétricas por densidad óptica (Buenos Aires y Mendoza).

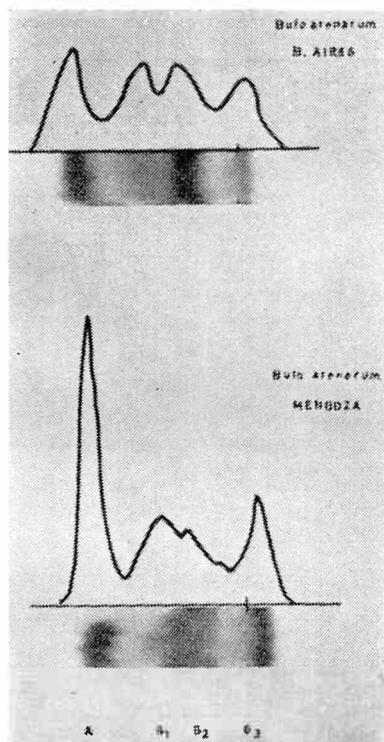


FIGURA 1

Se hace presente que los individuos de las muestras de Mendoza pertenecen a una población polimórfica, donde se presentan con muy elevado porcentaje individuos con reflejos profundos (prostotono, reflejo hipnótico), acompañados fenotípicamente por alteraciones de la pigmentación cutánea, con manchas más o menos evidentes de color amarillo cromo (¿feomelaninas?). Estos caracteres corresponden a una estructura génica peculiar de esta población, probablemente adaptativa en su ambiente ecológico, por ser representada su frecuencia en todas las otras poblaciones, ocupando nichos ecológicos dis-

tintos, por valores nulos o sumamente bajos (Cei, 1956; 1959). Reflejos y alteraciones pigmentarias se encontraban en absoluta mayoría en todos los individuos utilizados en las muestras de Mendoza, de proteínas frescas o conservadas.

A pesar de su relativo valor es interesante una breve comparación de los datos obtenidos con el examen de seroproteínas conservadas en otras especies del grupo *Bufo*, siempre en comparación con *Bufo arenarum*.

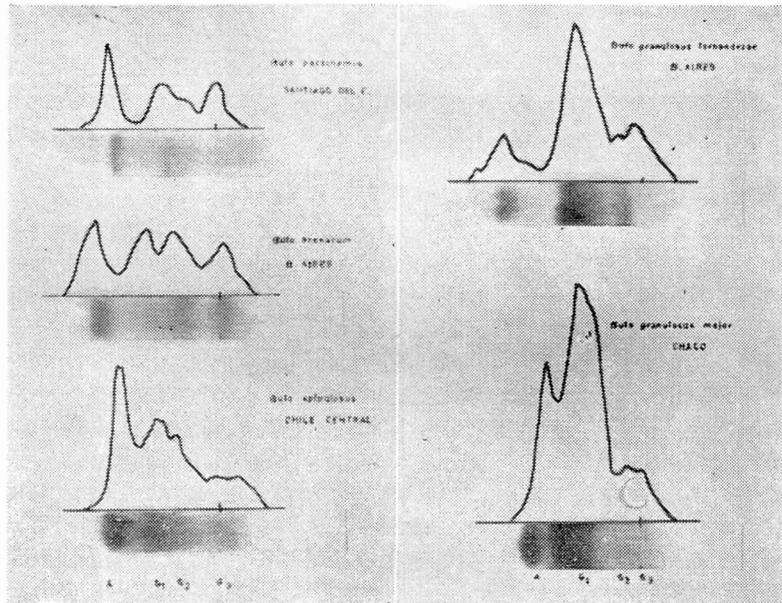


FIGURA 2

Nuestras muestras se conservaron a 4° C, manteniéndolas con mertiolato 1:10.000, y fueron examinadas contemporáneamente. Por la Tabla II se desprende que la fracción A presenta valores elevados en las muestras de *Bufo paracnemis* en comparación de las muestras de *Bufo arenarum*, con la excepción de las poblaciones de Mendoza y San Luis (zona árida). La relación entre las fracciones G1/G2 alcanza en *Bufo paracnemis* valores siempre más elevados que en *Bufo arenarum*, lo que es fácil observar directamente en los ferogramas aquí reproducidos y en las curvas que los acompañan. Consideramos pues que las diferencias observadas entre estas formas debe probablemente tener carácter sistemático de acuerdo con su posición taxonómica.

Bufo arenarum: Julio-Agosto 1959. MUESTRAS INDIVIDUALES - PROTEINAS FRESCAS

		A		
	n	G1	G2	G3
Mendoza:	24	21,60 ± 3,45		
Córdoba:	n	G1/G2 = 1,07	20,16 ± 2,33	27,11 ± 6,53
	9	24,31 ± 1,36	26,7 ± 1,90	22,07 ± 3,74
Tucumán:	n	22,10 ± 1,93	26,6 ± 2,01	23,70 ± 3,06
B. Aires:	10	20,61 ± 2,41	27,97 ± 2,91	21,16 ± 2,15
	n	0,73		

Diferencias poblacionales en las fracciones proteínicas séricas: t y p según Fisher

	t	P
Mendoza/Córdoba	3,66	0,01 — 0,001
	2,47	0,01 — 0,001
Mendoza/Tucumán	2,02	0,01 — 0,001
	0,64	0,01 — 0,001
Mendoza/B. Aires	2,94	0,01 — 0,001
	0,02	0,01 — 0,001
Córdoba/B. Aires	0,61	0,01 — 0,001
Córdoba/Tucumán	1,42	0,01 — 0,001
B. Aires/Tucumán	0,20 — 0,10	0,30 — 0,20

3,30	8,27	2,78
0,01 — 0,001	<0,001	0,02
0,54	8,15	1,25
0,60	<0,001	0,20
0,97	7,58	3,99
0,40 — 0,30	<0,001	0,01 — 0,001
4,55	1,03	0,67
0,01 — 0,001	0,40 — 0,30	0,60 — 0,50
3,08	0,11	1,07
0,02	>0,90	0,30
0,15	1,25	2,14
0,90 — 0,80	0,30 — 0,20	0,10

Bufo arenarum: pools proteínas conservadas - Poblaciones de Argentina (N = electroferogramas) Verano 1959

	A	G1	G2	G3
B. Aires n = 5	22,92 ± 0,71	22,86 ± 1,99 G1/G2 = 0,68	33,28 ± 2,73	22,82 ± 1,63
Tucumán n = 6	19,65 ± 1,46	23,21 ± 1,41	26,43 ± 1,36	30,68 ± 2,15
San Luis (Sierras) n = 6	23,26 ± 1,51	26,26 ± 1,94	29,15 ± 3,30	20,65 ± 0,93
S. Luis (Balde-zona árida) n = 5	31,36 ± 4,21	27,12 ± 3,43	23,42 ± 3,28	16,10 ± 2,01
Mendoza n = 5	27,40 ± 5,6	25,14 ± 1,33	23,56 ± 1,68	23,90 ± 1,55

Bufo paracnemis: pools proteínas conservadas - Poblaciones Norte Argentino (N = electroferogramas) Verano 1959

	A	G1	G2	G3
Santiago del E. n = 6	27,43 ± 1,68	28,15 ± 1,68 G1/G2 = 1,75	20,58 ± 2,05	23,76 ± 1,81
Tucumán n = 6	25,26 ± 3,07	26,18 ± 1,73	23,46 ± 1,47	25,21 ± 2,82
Jujuy n = 6	30,51 ± 2,46	28,26 ± 2,07	21,13 ± 1,28	19,58 ± 1,72

Damos también algunas otras gráficas de comparación entre fracciones seroprotéicas en otras especies de *Bufo* neotropicales y los ferogramas característicos de *Bufo arenarum*. Es evidente a la vista la diferencia existente entre *Bufo arenarum* y *Bufo spinulosus* (Chile Central) donde parece estar ya diferenciándose otras fracciones, como se nota por los picos de la curva. Más diferencias todavía son reveladas por las dos subespecies aquí referidas del conjunto de *Bufo granulatus*, *Bufo g. major* y *Bufo g. fernandezae*, que aparecen como constituyendo un sistema aparte. Será interesante en el futuro estudiar mejor dicho sistema, a la luz también de estudios inmunológicos, y en relación con la posición sistemática y filética de aquellas formas frente a los otros *Bufo* de Argentina. Queremos a este respecto poner en evidencia que estos primeros datos parecen confirmar la subdivisión hecha por Gallardo (1957) de *Bufo granulatus* en la Argentina en diversas subespecies ocupando nichos ecológicos y áreas geográficas distintas.

Concluyendo: este trabajo tiende a comprobar que las poblaciones polimórficas de *Bufo arenarum* de las zonas áridas del Oeste argentino, parecen acentuar diferencias seroproteicas frente a las demás poblaciones de esta especie en la Argentina, y que el método empleado puede ser de utilidad, dentro de ciertos límites, junto con otros datos derivados de métodos más clásicos, para establecer analogías bioquímicas inter e intra-específicas, y por ende aclarar mejor reales relaciones de afinidad biológica y filética.

BIBLIOGRAFÍA

- CEI, J. M. *Biológica*, 22, 45, 1956.
 " " " *Copeia*, 4, 1959.
 CEI, J. M. & BERTINI, F. (com. 1º Congr. Sudam. Zool. La Plata, 1959).
 GALLARDO J. M. *Rev. Mus. Arg. Ciencias Nat., Zool.*, 3, 6, 1957.
 JUTZ, A. *Mem. Inst. O. Cruz*, 28, 1, III, 1934.

DISCUSIÓN

- R. DONOSO BARROS: Considero la exposición de los doctores Bertini y Ceí, de enorme interés. Justamente el tipo de albúminas, de proteínas, que hemos tratado son proteínas de una enorme especificidad. Se sabe que las proteínas sanguíneas en muy poco grado, son afectadas por la ingestión de proteínas del medio externo, por cuanto la mayor parte, especialmente del grupo de las globulinas, y de las albú-

minas, no provienen directamente del metabolismo sino que pasan por una fase previa celular. La mayor parte de las albúminas sanguíneas, derivan justamente a partir de las células formadas que se destruyen y que son las que se distribuyen la tasa.

En segundo lugar hay un aspecto de especificidad considerable, que está justamente en toda esta gama de las globulinas y, probablemente se puedan equiparar en cierto grado con lo que ocurre en mamíferos, que representan la base de los anticuerpos. Se sabe que en general los problemas inmunitarios tienen un valor igual en relación con los problemas específicos. Por esto creo que este camino que se plantea desde el punto de vista de la serología es sumamente promisor para establecer un parentesco más sobre una base estructural y bioquímica.

Allí, en la exposición se ve que en líneas generales se sigue cierto camino que probablemente debe tener muchos huecos pero que se puede deducir. Se ve que hay una línea que viene de la parte del norte de la Argentina, probablemente del grupo *paracnemis*, pasando por el grupo de las cualidades del *Fernandezii*.

Y en segundo lugar, se ve que justamente la forma de las vertientes de la cordillera, la forma *arenarum* tiene una gran semejanza con el *spinulosus* y es muy posible que estas diferencias que se observan en *spinulosus* en Chile puedan establecer una enorme graviente. Es muy posible que en la época preandina halla habido una mayor conexión entre estas formas.

He escuchado con mucho agrado este trabajo que lo considero muy valioso desde el punto de vista de la evolución.

- J. M. CEI: En este caso respecto a lo que ha observado el colega Donoso, se plantearía un problema, de las distintas poblaciones de *arenarum*, cual es en este caso la más arcaica, la más primitiva, la que más se asemeja a *Bufo spinulosus* o a *Bufo paracnemis*. Claro que es muy difícil de resolver. Por ejemplo en la comparación del conjunto de *Bufo granulatus* hay un salto. No cabe duda de que hay una diferencia sustancial entre estos dos sistemas, *spinulosus*, *arenarum*, *paracnemis* y seguramente *marinus*. He hecho algunos esferogramas con material enviado por el Serological Museum de Rutgers University, que nos permiten afirmar que también *marinus* tiene una afinidad absoluta con *paracnemis*, caso coincidente los esferogramas. Y se van a repetir sobre materiales frescos

que nuestros colegas brasileños nos han obsequiado en ocasión de este Congreso. Pero, indudablemente con *granulosus*, no. Ahí estamos en una . . .

Se plantearía un problema muy interesante; justamente he conversado con el doctor Jeldes y el conjunto de *granulosus* llega muy al norte, llega —según el trabajo del doctor Gallardo— hasta Panamá, que prácticamente se relaciona después con los *Bufos* antillanos, con el grupo . . . Sería muy interesante poder seguir a través de este test de acuerdo a los límites de seguridad del mismo las distintas poblaciones más norteñas del *Bufo*, siguiendo hasta las Antillas y establecer, entonces, una cadena eventual de afinidades serológicas y establecer por lo menos el pase de subespecie como lo hemos visto en el caso de *major*, que parece que es algo muy extremo y seguirlo con respecto a las otras formas como podría ser *d'orbigny. granulosus granulosus*, *Bufo pigmaeus*, *major* y *carvalhoi*. Creo que es una puerta abierta para sucesivas observaciones.

- O. REIG: A mí me parece sumamente interesante sobre todo la iniciación para la fauna de Sudamérica y particularmente en este país de esta clase de observaciones que puedan servir tanto para establecer las relaciones naturales de distintas especies o géneros.

En relación con este problema específico, quiero dar a conocer una novedad que si bien viniendo de un campo paleontológico, puede tener una cierta significación.

Hace muy poco se encontró en el plioceno de la provincia de Buenos Aires una especie de *Bufo*. En primer lugar es la primera especie de *Bufo* conocida para nuestro registro paleontológico que es completamente intermedia entre *paracnemis* y *arenarum*. Es una especie que se llama *pisanoi* en un trabajo que esperamos poder dar a conocer con Casamiquela y que nos plantea un problema muy interesante.

Ustedes saben que el *Bufo paracnemis* tiene una distribución discontinua. Es un animal del Gran Chaco y de la Caatinga y que el *Bufo marinus* tiene distribución discontinua en la costa oriental del Brasil. Posiblemente con la distribución que llegue hasta Chile. Si existe la posibilidad, como lo plantea Cochram, de que el *Bufo paracnemis* sea mucho más afín con *arenarum* que con *marinus*, en fin, los datos que daba el doctor Cei no confirmarían este punto de vista. Y siendo que hay una forma morfológica intermedia por la anatomía craneana, tan neta

como este *Bufo pisanoi* del plioceno de la provincia de Buenos Aires.

Quedaría por explicarse el problema de la discontinuidad geográfica de *Bufo marinus* por un lado sea especie distinta o sea especie *ictericus* y *marinus* problema también para resolver atacándolo en forma más prolija y de la discontinuidad del *Bufo paracnemis* en el lado del Chaco y en la Caatinga.

Posiblemente puedan darse explicaciones de esta índole, todas conjeturas y meramente hipotéticas hasta ahora. Pero nosotros hemos pensado que quizá sería bueno como hipótesis de trabajo considerar la posibilidad de que el *Bufo paracnemis* sea una forma originada en *Bufo arenarum* y que corresponda a una especiación producida en la zona chaqueña particularmente al margen de su distribución lateral a la región chaqueña y que la región chaqueña originariamente haya sido más extensa y haya estado unida a la Caatinga. Parece que hay datos de la zoogeografía de algunos insectos y sobre todo de carácter fitogeográficos que comprobarían que la región de los campos altos intermedarios entre la Caatinga y el Gran Chaco fuese una formación fitogeográfica reciente y que antes habría una gran continuidad con toda la zona entre la Caatinga y la zona chaqueña. Y en este caso que esta irrupción de esta cepa de *Bufo paracnemis* haya aislado una población original del *Bufo marinus* y que haya habido una especiación en la zona selvática, costera y en la zona de la Ilea propiamente dicha.

Por supuesto que esto es una conjetura. Sería muy lindo poder atacar y buscar los datos de *Bufo marinus* de la zona de la hilea del *Bufo ictericus* y de todas las otras subespecies creadas últimamente que pueden ser de importancia para aclarar estas cosas.

Y por otra parte, que tengamos material como para hacer las confrontaciones morfológicas de todas estas afinidades que todavía no está hecha. En realidad estamos atacando el problema profundo de la sistemática serológica, cuando todavía no tenemos hecha la sistemática morfológica de estos animales porque se los conoce por sus caracteres externos y no por su anatomía externa.

Así que la complementación de todas estas cosas, posiblemente van a traer una gran claridad.

- R. RINGUELET: Para un mejor entendimiento de las consecuencias que se puedan sacar de este excelentísimo trabajo, que tanto habla de los nuevos caminos que se están

siguiendo en el Instituto de Ciencias Biológicas de Cuyo, quisiera preguntar qué procedencia exacta tenían los ejemplares de *Bufo arenarum* de la provincia de Buenos Aires y también los de Córdoba, con el objeto de poder o no referir estos hechos tan importantes, con otros hechos de tipo zoogeográfico de detalle que mucho interesan.

J. M. CEI: Contestando a la pregunta muy amable del doctor Ringuelet, diré que las muestras de la región de Buenos Aires proceden del partido de Avellaneda, muy cerca de aquí, entre La Plata y Buenos Aires. En cuanto a los ejemplares de Tucumán, proceden del río Salí. Y los de Córdoba, el doctor Salces, a quien tengo que agradecer una vez más.

F. SALCES: Son de plena ciudad, del río Primero.

J. M. CEI: En cuanto a los de Mendoza, proceden de un área comprendida entre la zona de Maipú y la zona de Las Heras.

S. CAPURRO: Yo quisiera hacer algunas preguntas al doctor Bertini. ¿Trabajaron con sueros de individuos o con "pool" de sueros? También quisiera saber si encontraron alguna diferencia entre los sueros frescos y los sueros también frescos pero conservados con mertiolato.

Son datos muy interesantes que pueden dar un índice del valor del método que a mí personalmente me resultan muy valiosos para resolver el problema, naturalmente no sólo de tipo sistemático, sino en colaboración con otros métodos cromatográficos.

N. BERTINI: Las proteínas que hemos utilizado conservadas han servido sólo en lo que se refiere a *Bufo* nada más que para apoyar los datos que hemos conseguido con proteínas frescas e individuales.

Los "pool" que tenemos en colecciones los tenemos por otras razones, porque estamos preservando material para estudio de carácter inmunológico y la hemos utilizado y expuesto a la crítica casualmente porque coincide. Ahora, todos los trabajos estadísticos y sobre el cual se apoyan las bases de las diferencias de las poblaciones de *Bufo*, son ejemplares de —casualmente 24 de Mendoza y 9 ó 10 de Córdoba— los que están dentro del límite del tiempo y de las posibilidades también, porque si se considera que cada una de las tiras debe ser dividida por cuatro y se hacen cuatro operaciones y por cada ejemplar existen varias tiras, por cada ejemplar de una distinta población y la población de cada especie, yo creo que pueden multiplicarse las operaciones y llegar a más de mil determi-

naciones colorimétricas. Comprendiendo también que las curvas deben ser cortadas en 30 partes.

S. CAPURRO: El mertiolato no afecta los resultados.

N. BERTINI: El mertiolato sí afecta. Parece más que el mertiolato mismo que el tiempo que se deja. Las fracciones más veloces, más de 12, se acumulan en la parte de origen.

Las proteínas tienden a ser desnaturalizadas y aumentan su afinidad hacia el papel. Hay una especie de arrastre de la parte de la albúmina de manera que queda arrastrada y absorbida por la tira.

S. CAPURRO: Deseo preguntar si en las fracciones que llaman ustedes G1, G2 y G3, que corresponden a las seroglobulinas, indudablemente, nunca han encontrado subdivisiones, de alguna de esas versiones. Es decir, que G1 aparezca con dos piques...

N. BERTINI: En el caso de *Bufo spinulosus*, por ejemplo, usted ha podido ver que en la parte de G3 hay una subdivisión. Ahora estas subdivisiones no son constantes, pero a estas subdivisiones constantes también las acompañan tiras que son descartadas. Además hay también animales que pueden presentarse enfermos y nosotros no podemos cerciorarnos.